

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОК КРОВИ**

***Генералов И.И. , Семенова Н.В. , Моисеева А.М.***

***УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»***

**Введение.** Изучение антител, проявляющих каталитическую активность, представляет собой новое направление, возникшее в последние годы развития иммунологии [2]. Учитывая, что при разверты-

вании иммунного ответа в живом организме возникает широкий спектр АТ, различных по специфичности и аффинности, был проведен ряд исследований по выявлению поликлональных АТ с каталитической функцией в условиях *in vivo* [3]. Начиная с конца 90-х годов предпринимаются активные попытки использовать абзимную активность АТ в клинических условиях [4]. Тем не менее, до настоящего времени возможности определения абзимной активности в диагностике аутоиммунных и других заболеваний остаются малоизученными.

Здесь существенную роль играют сложные взаимоотношения между собственно абзимной и соответствующей сывороточной ферментативной активностью. Все используемые до сих пор методы оценки абзимной активности требуют очистки исходного препарата иммуноглобулинов (ИГ) из сыворотки крови для доказательства принадлежности активности самим ИГ, а не сопутствующим энзимным контаминатам [2].

Наиболее развернутая схема очистки включает в себя комбинацию многих методов и состоит из нескольких этапов: (1) осаждение белков сыворотки сульфатом аммония; диализ; (2) аффинная хроматография (обычно с использованием матрицы с протеином G или протеином A); (3) отмывание буфером с неионным детергентом (обычно Тритон X-100); (4) отмывание слабокислым раствором (цитрат с pH 4.6-5.0); (5) диализ с последующей MonoQ- или DEAE-хроматографией (не всегда используемый этап); (6) ВЭЖХ или гель-фильтрация (обычно на матрице Toyopearl HW 55) в диссоциирующих условиях ("кислый шок" при pH 2.8, раствор 7М мочевины или 6М гуанидин-хлорида); (7) аффинная очистка на антигене-субстрате (белке, ДНК или РНК) [2].

Данная комбинированная методика является сложной, длительной и трудоемкой в исполнении. При этом очевидно, что на каждом этапе могут происходить изменения конформации молекул ИГ, изменяющие исходную абзимную активность. Например, отмывка слабокислым цитратным буфером при pH 4.6-5.0 приводит к элюции с колонки целого субкласса (G2) исходного препарата IgG. Применение эксклюзионной ВЭЖХ или гель-фильтрации на матрицах типа Toyopearl HW55 в диссоциирующих условиях в качестве одного из этапов очистки имеет неоспоримое преимущество: диссоциация ведет к разрушению всех нековалентных комплексов с получением чистых ИГ. Однако при длительном (час и более) нахождении препарата абзима в диссоциирующих условиях происходит неконтролируемое изменение (преимущественно – снижение) абзимной активности [2, 3]; аналогично, такое же уменьшение активности может наблюдаться и при ис-

при использовании сильных анионообменников [2, 3]. Поэтому гель-фильтрация в диссоциирующих условиях используется в основном для контроля качества препарата IgG при отработке процесса очистки абзимов.

Отсюда, по мнению многих авторов, до сих пор не существует удовлетворительного способа получения каталитически активных фракций поликлональных ИГ. Соответственно не разработаны способы прямого определения абзимной активности непосредственно в сыворотке без выделения ИГ. В настоящей работе мы предприняли попытку прямого определения ферментативной активности, связанной с иммуноглобулинами, без использования многостадийного выделения последних из сыворотки крови больного.

**Материалы и методы.** В работе были использованы бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилид (БАПНА) производства фирмы Sigma, агароза, конъюгированная с белком А золотистого стафилококка (производства института им. Л. Пастера, г.С.-Петербург, Россия), ДНК тимуса теленка (Sigma), Остальные реактивы – отечественного производства квалификации "хч" и "чда. В качестве материала для исследования использовалась сыворотка крови больных СКВ.

Для адсорбции иммуноглобулиновой фракции сыворотки крови к уравновешенному 0,05 М трис-HCl буфером pH 7,4 сорбенту со стафилококковым протеином А в объеме 0,5 мл добавляли 1,0 мл раствора испытуемой сыворотки, разведенной в 10 раз физиологическим раствором. Инкубировали в термостате 1 час с многократным перемешиванием. После этого колонку последовательно промывали 0,1М фосфатным буфером pH 7,4 с 1% раствором тритона X-305, а затем без детергента в количестве 5-6 объемов колонки до исчезновения белка в элюенте. Далее колонку уравнивали буферным раствором для постановки реакции.

Абзимную активность в сыворотке больных оценивали с помощью разработанных нами ранее методов определения ДНКазной и БАПНА-амидазной активности [1]. Полученные результаты выражали как разность между опытными и контрольными пробами, выраженную в единицах оптической плотности (ЕОП).

**Результаты и обсуждение.** После учета реакций оказалось, что с помощью предложенного нами методического подхода была зарегистрирована достоверная ДНКазная и амидазная активность препарата АТ, связанного с иммобилизованным на матрице протеином А. Так, в частности, в одном и том же препарате IgG, выделенном от одного больного, определялась как ДНКазная абзимная активность, так и БАПНА-амидазная активность ( $\Delta\text{ЕОП}_{\text{средн}} = 0,0685$ ).

Тем самым нам удалось показать возможность определения ферментативной активности, связанной с иммуноглобулинами, без выделения АТ из сыворотки в виде чистого препарата. При этом после адсорбции IgG можно в одной пробе последовательно определять несколько различных видов абзимов.

Очевидным преимуществом предложенной методики является максимальное сохранение нативности АТ перед определением их абзимного действия.

Разработанный нами подход может быть использован в дальнейшем для определения абзимов в клинике с одновременным использованием одной и той же пробы сыворотки для выявления разных видов абзимной активности.

Литература:

1. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность препаратов IgG у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой // Иммунология. - 1998. - N3. - С.54-56.
2. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // Биохимия - 2000. - Т.65, N11. - С.1245-552.
3. Catalytic Antibodies. Ed. Eh Keinan. Weinheim. Wiley-Vch Verlag. 2005. 578P
4. Nevinsky G.A., Breusov A.A., Baranovskii A.G. et al.// Med Sci. Monit. - 2001 - Vol 7, N2. - P.201-211.